

Title	Study on liquid-liquid phase separation of an IgG1 monoclonal antibody
Author(s)	西, 宏高
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59162
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	にし 西	ひろ 宏	たか 高
博士の専攻分野の名称	博 士（工学）		
学 位 記 番 号	第 2 4 9 7 1 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 12 月 12 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科生命先端工学専攻		
学 位 論 文 名	Study on liquid-liquid phase separation of an IgG1 monoclonal antibody (IgG1 モノクローナル抗体の液 - 液相分離に関する研究)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 福井 希一 (副査) 教 授 金谷 茂則 教 授 藤山 和仁 教 授 原島 俊 教 授 渡邊 肇 教 授 大竹 久夫 教 授 福岡英一郎 教 授 紀ノ岡正博 教 授 村中 俊哉 教 授 仁平 卓也		

論 文 内 容 の 要 旨

抗体医薬品は種々の難治性疾患を対象としてその開発研究がさかんに行われているが、経口投与が難しく、点滴静脈内投与せざるを得ないことが患者の大きな負担となっている。そこで患者による自己投与が可能で、投与も短時間で終了する皮下注製剤が強く望まれているが、そのためには抗体医薬品を1 mL以下にまで濃縮（高濃度化）する必要がある。しかし、高濃度化した抗体溶液は、粘度や凝集体の増加、濁度の増加という溶液物性の変化を起こすことが近年報告されている。

抗Fasヒト化IgG1抗体（以下、抗体A）は低イオン強度・低温条件下において白濁し、その後、濃度が異なる2つの領域に分離するという興味深い溶液物性を示す。類似の物性を示す抗体医薬品は、抗体A以外に1種類報告があるものの、その物性には理解されていない点が多い。そこで本研究では、抗体医薬品の基礎物性評価を目的として、抗体Aの低イオン強度・低温環境における白濁・分離挙動について、分子間相互作用の関連から評価し、今後順次開発される抗体医薬品の分子設計や処方・製法研究に役立つ知見を得ることを目的とした。

抗体Aの分離挙動を、異なるイオン強度とpHにおいて調べたところ、溶媒を低イオン強度かつpHが抗体Aの等電点に近い緩衝液に置換した場合、抗体Aが濃縮された濃厚相と濃度が希薄な希薄相の2相に分離することが明らかになった。この2つの領域の抗体Aの濃度は相分離前の抗体Aの濃度によらず一定であったことから、この現象が液-液相分離であることが確認された。一方、溶液のイオン強度およびpHは液-液相分離後の2相の抗体Aの濃度に大きく影響し、イオン強度が高く、pHが抗体Aの等電点から離れると、2相の抗体Aの濃度差は小さくなり、やがて2相は消失した。この液-液相分離は可逆的なプロセスであり、液-液相分離した溶液はイオン強度とpHを変化させることにより、品質を維持したまま、もとの均一な溶液に戻すことが可能であった。

抗体A溶液の相図を作成すると、動的光散乱法による抗体Aの流体力学的直径は相図の内側で急激に増加し、このとき超遠心分析でも会合体が検出された。分離した濃厚相の粘度は非常に高く、抗体分子が自己会合している場合に特徴的な非ニュートン流体であった。これらの結果から、抗体Aの分子間相互作用が抗体A溶液の液-液相分離を引き起こすことが示唆された。

抗体Aから調製したFabの流体力学的直径はFabの濃度によらず一定であったが、Fcの流体力学的直径は抗体Aと

同様に増加が認められた。また、Fcは抗体Aおよび抗体AのFcと相互作用することが表面プラズモン共鳴法により観察された。同様の相互作用はFabでは観察されなかった。これらの結果から、相互作用部位はFcドメインに存在することが示唆された。

以上の結果から、抗体Aは静電的相互作用により、Fcドメインを介して自己会合することで液-液相分離を引き起こすことが示唆された。本研究で行った抗体Aの物性評価結果は、今後順次開発される抗体医薬品の分子設計や処方・製法研究の際の極めて有用な情報となり、抗体Aのような溶液物性を示す治療用モノクローナル抗体では、イオン強度を高くしかつ抗体の等電点と異なるpHで製剤化するが非常に重要となる。抗体溶液の液-液相分離挙動は抗体Aに限らず、抗体のアミノ酸配列が一定の条件を満たせば、抗体Aと類似の挙動を示すと考えられ、実際、その後、同様の物性を示す抗体が報告されている。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文では、低イオン強度条件下で観察されるヒト化IgG1モノクローナル抗体（抗Fasヒト化IgG1抗体、以下、抗体A）の液-液相分離現象とそれを引き起こす分子間相互作用を評価した結果について述べている。

抗体Aは、低イオン強度・低温条件下において白濁した後、抗体Aが濃縮された濃厚相と濃度が希薄な希薄相の2つの領域に分離した。この2つの領域の抗体Aの濃度が分離前の抗体Aの濃度に関わらず一定であること、また、分離が可逆的なプロセスであることから、この現象が液-液相分離であることを示した。この結果はまた、抗体医薬品の溶液がしばしば白濁する原因が液-液相分離によるものであることを強く示唆する。

2相の抗体Aの濃度は溶液のイオン強度およびpHに依存し、イオン強度が低く、pHが抗体Aの等電点に近いとき、液-液相分離は強く引き起こされる。動的光散乱法、超遠心分析法、粘度測定により、低イオン強度条件下で、抗体Aの分子間相互作用が確認される。これらの結果は、静電的相互作用による抗体Aの分子間が液-液相分離を引き起こすことを示している。

モノクローナル抗体の抗原特異性は抗原結合部位が存在するFab領域が担っており、Fc領域にはその抗体に特異的なアミノ酸配列は存在しないことから、抗体分子の物性の違いはFab領域のアミノ酸配列の違いによるものと予想される。しかし、Fab領域を介した相互作用は、動的光散乱法と表面プラズモン共鳴法のいずれでも検出されない。一方、Fcフラグメントは、流体力学的直径の増加のみならず、表面プラズモン共鳴法でも抗体Aおよび抗体AのFcフラグメントとの相互作用が認められる。これらの結果は抗体Aの分子間相互作用部位がFc領域に存在することを強く示唆するものである。

本論文は、抗体Aの基礎溶液物性を分子間相互作用に主眼を置いて評価するものであり、その相互作用部位が溶液のイオン強度およびpHに依存し、また、相互作用部位がFc領域に存在することを明らかにすることにより、今後順次開発される抗体医薬品の分子設計および処方・製法開発に重要かつ新規な知見を加え、大きく寄与するものである。

よって本論文は博士論文として価値のあるものと認める。